



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets

191

(11) Numéro de publication

0 124 502

A2

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 84870057.1

(51) Int. Cl. 1: C 07 D 519/04, A 61 K 31/475

(22) Date de dépôt: 26.04.84

(30) Priorité: 29.04.83 LU 84784  
29.12.83 LU 85161

(71) Demandeur: OMNICHEM Société anonyme, 12 Avenue de Broqueville, B-1150 Bruxelles (BE)

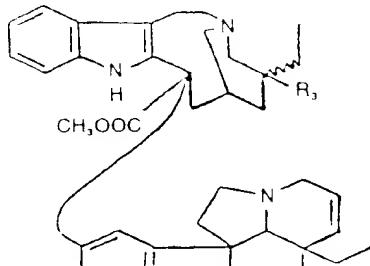
(43) Date de publication de la demande: 07.11.84  
Bulletin 84/45(72) Inventeur: Trouet, André Benoît Léon,  
29, Predikherenberg, D-3009 Winksele (BE)  
Inventeur: Rao, Kadukuri Sivaprasada Bushana Dr.,  
11, rue Kwakembienne, B-1331 Rosieres (BE)  
Inventeur: Hannart, Jean-Alfred Alphonse, 25, avenue  
d'El Pirere, B-1302 Dion-Valmont (BE)  
Inventeur: Dejonghe, Jean-Paul, 94 rue Ch. Jaumotte,  
B-1350 Wavre (BE)(84) Etats contractants désignés: AT BE CH DE FR GB IT LI  
LU NL SE

(74) Mandataire: Van Malderen, Michel et al, p.a. Freylinger &amp; Associés 22 avenue J.S. Bach (bte 43), B-1080 Bruxelles (BE)

(54) Nouveaux conjugués de la vinblastine et de ses dérivés, procédé pour leur préparation et compositions pharmaceutiques contenant ces conjugués.

(57) L'invention se rapporte à de nouveaux conjugués de la vinblastine et de certains de ces dérivés connus avec des protéines, fragments de protéines, acides aminés ou amides, servant d'agent antitumoral. L'invention comprend également certains intermédiaires actifs en chimiothérapie, et des dérivés aminés de ceux-ci.

Ces composés répondent à la formule générale suivante:

R<sub>1</sub>

dans laquelle A représente un «bras» tel que  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{COCH}_2-\text{CH}_2\text{CO}-$ ,  $\text{COCH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CO}-$ , R<sub>1</sub> représente un radical protéique éventuellement modifié, un groupe amino NR<sub>2</sub>, un chlore ou un groupe ester d'acide aminé lié via la fonction amine et R<sub>2</sub> représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide  $\alpha$ -aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone, R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> représentent des groupes alkyle comportant de 1 à 3 atomes de carbone ou, ensemble, un groupe alkanediyle comportant de 3 à 5 atomes de carbone.

EP 0 124 502 A2

NOUVEAUX CONJUGUES DE LA VINBLASTINE ET DE SES DERIVES, PRO-  
CEDE POUR LEUR PREPARATION ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES  
CONTENANT CES CONJUGUES.

La présente invention se rapporte à de nouveaux conjugués de la vinblastine et de certains de ses dérivés connus avec des protéines, fragments de protéines, acides aminés ou amines servant d'agent anti-tumoral.

L'invention s'étend également à un procédé pour les préparer et  
5 à des compositions pharmaceutiques contenant ces conjugués.

La vinblastine et certains de ses dérivés, en particulier la vincristine ou la vindésine, ont déjà été couplés à des protéines par exemple l'albumine ou diverses immunoglobulines. Il en résulte des produits de couplage ou  
10 des composés dits "conjugués". Nous relevons notamment les références suivantes de la littérature :

- J.D.Teale, Jacqueline M.Clough et V.Marks, Br.J.Clin.Pharmac. 4, 169-172 ,1977
- C.H.J.Ford, C.E.Newman, J.R.Johnson, C.S.Woodhouse, T.A.Reeder, G.F.Rowland, R.G.Simmonds, Br.J.Cancer 47, 35-42, 1983
- M.J.Embleton, G.F.Rowland, R.G.Simmonds, E.Jacobs, C.H.Marsden, R.W.Baldwin Br.J.Cancer 47,43-49, 1983
- J.R.Johnson, C.H.J.Ford, C.E.Newman, C.S.Woodhouse, G.F.Rowland, R.G.Simmonds Br.J.Cancer , 44, 472-475, 1981
- 15 - Eli Lilly Eur.Pat.Applic. , Publ. n°56.322, 21.07.82
- R.A. Conrad, G.J.Cullinan, K.Gerzon, G.A.Poore J.Med.Chem. 22, 391, 1979

Le couplage de ces dérivés bis-indoliques a été entrepris non seulement dans le but de mettre au point de nouveaux réactifs immunologiques mais surtout en vue de la préparation de substances anti-tumorales plus actives ,plus sélectives et moins toxiques.

Dans cette dernière optique de nombreux conjugués protéiques avec d'autres agents antitumoraux sont actuellement étudiés. Il en est en particulier ainsi avec des conjugués d'anticorps et d'un fragment de la ricine ou de conjugués d'albumine et de 5 méthotrexate (Demande de brevet français 2.437.213, C.M. Industries B.C.F. Chu, S.B. Howell J. of Pharmacology and Exp. Therapeutics, 219 (2), 389-393, 1981).

Les anti-corps monoclonaux, en particulier ceux d'origine humaine, 10 couplés aux médicaments anti-tumoraux connus sont plus particulièrement l'objet d'études diverses.

On relèvera enfin que l'utilisation et l'évaluation de complexes 1:1 d'alcaloïdes bis-indoliques avec la tubuline a été décrite dans le brevet belge 854.053. Dans certains cas il peut en résulter une toxicité moindre et une activité chimio- 15 thérapique plus importante que celles des alcaloïdes libres correspondants.

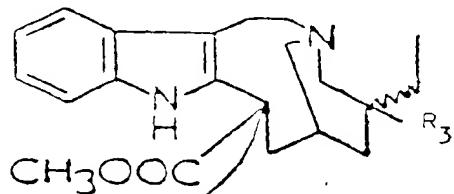
La présente invention concerne des produits nouveaux qui sont des conjugués de la vinblastine ou de dérivés de la vinblastine avec des protéines, des fragments de protéines, des acides 20 aminés ou des amines simples caractérisés en ce que le couplage est effectué par l'intermédiaire d'un groupe ester dérivé du groupe hydroxyle du carbone 4 du squelette de la vinblastine.

Ces conjugués suivant l'invention sont caractérisés en ce que la protéine, le fragment de protéine ou l'amine est couplée 25 au composé de type vinblastine par l'intermédiaire d'un bras, par condensation préalable du dérivé de la vinblastine avec un dérivé organique bifonctionnel, éventuellement activé, selon une forme d'exécution préférée.

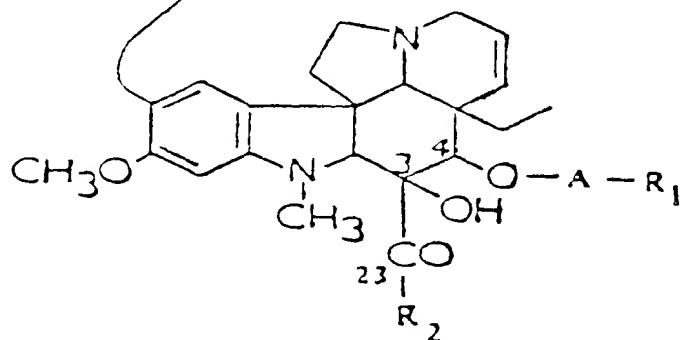
Le dérivé de la O-4-désacétylvinblastine peut être par exemple 30 la vindésine, la O-4-désacétylvinblastine couplée en C-3 avec un acide aminé ou la O-4-désacétyldésoxy-4'-vinblastine ou un dérivé vinblastinoyl-23 d'ester d'acide aminé.

Les composés de l'invention répondent plus particulièrement à la formule générale suivante

5



10



15

20 dans laquelle A représente un "bras" tel que  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ , n variant de 1 à 5,  $\text{R}_1$  représente un radical protéique éventuellement modifié,  $\text{R}_2$  représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide alpha-aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone,  $\text{R}_3$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle, chaque fois dans les deux configurations possibles ainsi que leurs sels d'addition avec un acide minéral ou organique.

25 Il est bien entendu que le bras du type acétate, hémisuccinate, 30 hémidiglutarate ou homologue supérieur peut être substitué, par exemple par un groupe alkyle ou amino, tout en conservant l'activité qui caractérise les composés de l'invention.

35

Dans l'art antérieur, la liaison était effectuée par l'intermédiaire d'un lien amide au niveau de la fonction vinblastinoyl-23 du dérivé bis-indolique. De manière surprenante nous avons constaté que l'activité anti-tumorale peut être mieux conservée lorsque la liaison est effectuée 5 en C-4 plutôt qu'en C-23.

Les dérivés de la présente invention sont obtenus, dans une première étape, par condensation du chlorure d'acide chloroacétique ou d'un anhydride, par exemple l'anhydride chloroacétique, succinique, 10 glutarique ou homologue supérieur, sur l'hydroxyle en C-4 de la O-4 désacétylvinblastine ou l'un des dérivés du type O-4 désacétylvinblastine - carboxamide-3.

Les dérivés 4-chloroacétate, hémisuccinate ou hémiglutarate ainsi obtenus 15 sont alors condensés avec la protéine, l'acide aminé ou l'amine simple dans un solvant dans lequel ces composés sont solubles. On peut à cette fin utiliser un mélange eau-dioxane à un pH adéquat maintenu par un tampon, par exemple un tampon borate. La condensation est confirmée par chromatographie ou électrophorèse. Dans ce dernier cas 20 on peut utiliser de la vinblastine radio-active (par exemple tritiée) afin de faciliter la caractérisation.

L'obtention du chloro-acétate en C-4 de la vinblastine est décrite par W.W.Hargrove Lloydia, 27 (4), 342, 1964. Il peut ainsi être obtenu par 25 action de l'anhydride chloroacétique sur la désacétyl vinblastine dans le dichlorométhane.

30

35

Du point de vue chimique la condensation avec les protéines peut s'expliquer par l'obtention de liens covalents résultant de la réaction des groupes amines de la lysine protéique avec le chlore activé de la fonction chloroacétate ou avec le groupe ester activé dérivé de l'hémisuccinate ou 5 hémiglutarate.

L'albumine de sérum bovin par exemple comprend 56 résidus aminés de lysine. Le nombre de molécule de vinblastine par protéine variera en fonction des conditions opératoires mais sera généralement compris entre 10 1 et 34.

L'activation peut être effectuée de manière classique par traitement avec un chloroformiate d'alkyle, de préférence le chloroformiate d'éthyle ou d'isobutyle, en présence d'une base aminée telle la N-méthyl pipéridine 15 ou la N-méthyl morpholine.

La condensation peut être effectuée *in situ* sur le mélange réactionnel contenant l'anhydride activé. Dans la plupart des cas l'anhydride activé peut cependant aussi être isolé.

20 Le conjugué obtenu est isolé au moyen de méthodes classiques utilisées en chimie ou, dans le cas de conjugués protéiques, en biochimie. Le conjugué protéique est ainsi précipité du milieu réactionnel par addition d'acétone, puis centrifugé, rincé, lyophilisé et purifié par filtration sur 25 gel. Eventuellement on peut soumettre le dérivé ainsi obtenu à une réaction de succinylation classique qui permet d'éviter des problèmes d'agrégation que caractérisent certaines protéines, conjuguées ou non.

30

35

Les protéines qui peuvent être avantageusement utilisées sont en particulier l'albumine de sérum bovin ou humain, la fétuine ou des immunoglobulines, ces dernières étant éventuellement obtenues par la technique des anti-corps monoclonaux. Dans ce dernier cas, l'utilisation d'anti-corps monoclonaux d'origine humaine et montrant une certaine spécificité vis à vis de tumeurs humaines s'avère particulièrement intéressante.

Les protéines utilisées peuvent également être traitées afin d'être sélectivement modifiées. Ces modifications permettent d'obtenir des conjugués protéiques qui seront, lors de leur utilisation thérapeutique préférentiellement concentrées au niveau de certains tissus, par exemple au niveau du foie. Il est ainsi possible, préalablement à la condensation du dérivé de la vinblastine à la protéine, de galactosyler cette dernière. La galactosylation est effectuée en appliquant par exemple le mode opératoire décrit par G.Wilson dans The Journal of Biochemistry , 253 (7) 2070-2072, 1978.

Les essais in-vitro effectués avec les composés de l'invention pour démontrer leur activité anti-tumorale indiquent que la formation du conjugué par un lien en C-4 peut être plus avantageuse que lorsque ce lien est effectué en C-3.

Le couplage via le carbone 3 de la vinblastine ou de ses dérivés s'effectue de manière classique en formant, dans une première étape, l'hydrazide en C-23 (carbohydrazide) puis l'azoture d'acide correspondant par nitrosation. L'azoture est alors directement couplé avec la protéine.

Cet azoture d'acide peut cependant aussi être condensé de manière également connue avec un ester d'acide aminé , par exemple un ester méthylique. La fonction ester de l'acide aminé peut être à son tour soumise à une hydrazinolysé puis à une nitrosation. Le nouvel azoture 5 d'acide du produit de couplage acide aminé-vinblastine est alors condensé avec la protéine. L'acide aminé constitue dans ce cas le lien unissant la protéine à la molécule de vinblastine.

10 On a ainsi obtenu des dérivés de condensation couplés en C-3 ou C-4 et O-4-désacétylés par exemple du type

a)couplage via le carbone C-3

15 vinblastine/-fétuine couplée en C-3(Fét-VDS-C-3),

vinblastine/-fétuine succinylée couplée en C-3(Fét(S)-VDS-C-3)

vinblastine-isoleucyl-fetuine (Fét-Ile-VDS-C-3)

vinblastine-tryptophyl-albumine de sérum bovin (BSA-TrpV-C-3) (ex 1)

vinblastine-tryptophyl-albumine de sérum bovin succinylée

20 (BSA(S)-TrpV-C-3)

b) couplage via le carbone C-4

25 vindésine-0-4-chloracétate (ex 2)

vindésine-0-4-chloracétate + albumine de sérum bovin (BSA-VDS-C-4)(ex 3a)

vindésine-0-4-chloracétate + albumine de sérum bovin succinylée (BSA(S)-VDS-C-4) (ex 3b)

30 vindésine-0-4-chloracétate + albumine de sérum humain (AH-VDS-C-4) (ex 4a)

vindésine-0-4-chloracétate + albumine de sérum humain galactosylée (AHgal-VDS-C-4) (ex 4b)

vindésine-0-4-choracétate + pyrrolidine  
 vinblastine-C-3-isoleucinate d'éthyle-0-4-chloracétate (ex 5)  
 vinblastinoyl-23-isoleucinate d'éthyle-0-4- chloracétate + albumine de  
 sérum bovin succinylée (BSA(S) - VIIe-C-4) (ex 5)

5 vindésine-0-4-hémisuccinate + pyrrolidine (ex 6)  
 vindésine-0-4-hémisuccinate + albumine de sérum bovin  
 (BSA-Succ-VDS)(ex 7)  
 vindésine-0-4- hémisuccinate + albumine de sérum humain  
 10 (AH-Succ-VDS)(ex 8)  
 vindésine -0-4-hémisuccinate + albumine de sérum humain galactosylée  
 (AHgal-Succ-VDS)(ex 9)  
 vindésine-0-4-hémisuccinate + immunoglobulines non spécifiques  
 (IgG)(IgG-Succ-VDS)(ex 10)

15 vindésine-0-4-hemisuccinate + IgG anti-milk fat globule (IgG-anti MFG)  
 (IgG anti MFG-Succ-VDS)(ex 11)  
 vinblastine-0-4-hémisuccinate + pyrrolidine (ex 12)  
 vinblastine-0-4-hemisuccinate + éthyltryptophanate (ex 13)

20 deoxyvinblastinoyl-23-tryptophanate d'éthyle-0-4-hémisuccinate +  
 pyrrolidine (ex 14)  
 deoxyvinblastinoyl-23-tryptophanate d'éthyle-0-4-hémisuccinate + albumine  
 de sérum bovin (BSA-Succ-DeoxyVTrpE) (ex 15)  
 déoxyvindésine-0-4-hémisuccinate + tryptophanate d'éthyle (ex 16)

25 vinblastinoyl-23-tryptophanate d'éthyle-0-4-hémisuccinate + pyrrolidine  
 (ex 17)  
 vinblastine -0-4 hémiglutarate +pyrrolidine (ex 18)

Les exemples suivants illustrent de manière non limitative le procédé conduisant aux composés de l'invention.

A. Couplage via le carbone C-3

5

Exemple 1

Vinblastine-tryptophyl-albumine de sérum bovin (BSA-Trp V-C-3)

10 Dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux, on introduit le dérivé 4-désacétyl-VBL<sub>3</sub>-Trp-méthyl ester radioactif (250 mg, 0,26 mmol) dans 2,5 mL d'une solution 1:1 (v/v) d'hydrazine anhydre dans l'éthanol. La solution est agitée sous argon, à 60°C pendant 5 h et à température ambiante pendant une nuit. Le mélange est refroidi, dilué avec 50 mL d'H<sub>2</sub>O désionisée et 50mL d'une solution saturée en NaCl et extrait avec 3 portions de 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les phases organiques sont réunies, lavées successivement avec 50 mL d'H<sub>2</sub>O, 100 mL d'une solution saturée en NaCl, et séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après évaporation du solvant, on isole 217 mg (0,23 mmol) de 4-désacétyl-VBL<sub>3</sub>-Trp-monohydrazide que l'on engage sans purification dans les réactions ultérieures.

15 Le 4-désacétyl-VBL-Trp-monohydrazide (0,23 mmol) est dissous dans une solution contenant 5 ml de MeOH et 16 mL d'HCl 1 N. La solution est refroidie à -10°C et 45 mg de NaNO<sub>2</sub> sont ajoutés avec agitation vive. Après 10 min, le pH de la solution est ajusté à 8,5 à l'aide d'une 20 solution saturée en NaHCO<sub>3</sub>. L'azide est extrait rapidement avec plusieurs portions de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> froid. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées à l'évaporateur rotatif. Le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est remplacé progressivement par du dioxane.

30

35

10

L'azide, en solution dans le dioxane est ajouté goutte à goutte en quantité équimolaire à une solution de BSA (269 mg) dans du  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 N ajusté à pH 9 avec du NaOH dilué. En fin d'addition, le pH est ajusté à 9 avec du NaOH 1 N. Le mélange est agité à température ambiante pendant 72 h. L'excès d'azide est détruit par addition de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  10 % et agitation pendant 1 h. La protéine est précipitée par addition de 6 volumes d'acétone froid et centrifugée (Centrifugeuse Internationale, 30 min, 1.500 RPM). Le culot est rincé 2 fois avec de l'acétone froid et lyophilisé. Le conjugué est purifié par chromatographie sur Séphadex G25. Les fractions contenant le conjugué sont réunies et soit lyophilisées, soit concentrées par ultrafiltration sur membrane Diaflo. Le rendement est de 270 mgr de (BSA-TrpV-C-3)

#### B. Couplage via le carbone C-4

15

##### Exemple 2.

###### vindésine-0-4-chloracétate

20

Dans un ballon, on introduit 0,92 mmol de vindésine, 25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et 4,1 mmol d'anhydride chloroacétique. La solution est agitée en absence de lumière pendant 14 h. On ajoute 25 mL de méthanol. On agite à température normale pendant deux heures. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu dissous dans 500 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , lavé par une solution aqueuse de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dilué à froid. Après évaporation de la phase organique le résidu est dissous dans 47 mL de méthanol contenant 11,2 mL d'eau et 2,33 g de silice. Le mélange est agité 6 h à température normale. La silice est séparée par filtration et lavée à plusieurs reprises avec du méthanol chaud. Le filtrat est concentré sous vide, alcalinisé

35

avec une solution d'ammoniaque diluée et extrait au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Les extraits sont réunis, séchés sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et évaporés à siccité. La purification est effectuée sur colonne de silice en éluant avec un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:5\% \text{ MeOH}$ . Rendement 88 %.

5

Spectre infra-rouge : 3470, 3040, 2970, 2880, 1740, 1690, 1615, 1510, 1500, 1430, 1225, 1190, 1010, 740  $\text{cm}^{-1}$

### Spectre de masse 830 ( $M + 1$ ), 813, 796, 773, 754, 297, 277, 293, 108

10 Spectre de résonance magnétique nucléaire: ppm 8(1H,s,NHind),  
 7,45(1H,d), 7,2-7,0(4H,m), 6,9(1H,d), 6,5(1H,s), 6,05(1H,s),  
 5,8(1H,m), 5,5 (1H,m), 5,28(1H,d), 4,0(2H,CH<sub>2</sub>Cl),  
 3,7(3H,s,-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,55(3H,s,OCH<sub>3</sub>), 2,8(3H,s,NCH<sub>3</sub>), 0,9-0,65(8H,m).

### 15 Exemple 3

a) Couplage en C-4 de la O-4-désacétyl-vindésine ( BSA-VDS-C-4)

20 Le chloroacétate en C-4 de la 0-4 désacétyl-vindésine radioactive (150 mg), dissout dans 5 mL de dioxanne est ajouté goutte à goutte à une solution de 216 mg de BSA (albumine de sérum bovin, Cal Biochem) dans 5 mL de tampon borate 0,4 M pH 9,0. Le mélange est agité à température ambiante pendant 48 h. Le conjugué est précipité par addition de 6 volumes d'acétone et centrifugé 30 min à 1300 rpm. Le 25 précipité est lavé 2 fois dans l'acétone et centrifugé dans les mêmes conditions. Après ces deux rinçages le précipité est lyophilisé et purifié par filtration sur gel G-25 (3x90 cm) équilibré dans une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M pH 7,8. Le pic exclu est récupéré et lyophilisé. Le 30 contenu en protéine est mesuré par la technique de Lowry et le contenu en alcaloïde estimé par mesure de la radioactivité. Le conjugué obtenu contient 2,5 moles de vindésine par mole de BSA. Par chromatographie sur gel d'agarose on démontre que la radioactivité est bien associée aux protéines.

## b) Succinylation ( BSA(S)-VDS-C-4 )

Le conjugué est dissous dans l'eau à une concentration de 100 mg/5mL H<sub>2</sub>O et le pH de la solution porté à 7 avec une solution de NaOH 0,1 N.

5 55 mg d'anhydride succinique sont alors ajoutés par petites fractions. Le pH est maintenu à 7 par addition de NaOH 0,1 N. Lorsque le pH est stabilisé on ajoute encore 55 mg d'anhydride succinique. La solution est agitée 1 h à température ambiante, dialysée à l'eau à 0°C pendant une nuit et lyophilisée. Les contenus en protéines et en alcaloïdes sont 10 estimés selon les techniques décrites en a).

## Exemple 4

## 15 a) Couplage en C-4 de la O-4-désacétyl-vindésine (AH-VDS-C-4)

Le chloroacétate en C-4 de la O-4-désacétyl-vindésine radioactive (140 mg), dissout dans 3 mL de dioxane est ajouté goutte à goutte à une solution de 200 mg d'albumine humaine (Mérieux), dans 2 mL de tampon 20 borate 0,34 M pH 9,0. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Le conjugué est précipité par addition de 6 volumes d'acétone et centrifugé 30 min à 1300 rpm. Le précipité est lavé 2 fois dans l'acétone et centrifugé dans les mêmes conditions. Après ces deux rinçages le précipité est lyophilisé et purifié par filtration sur gel G-25 25 (3x90 cm) équilibré dans une solution de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M pH 7,8. Le pic exclu est récupéré et lyophilisé. Le contenu en protéine est mesuré par la technique de Lowry et le contenu en alcaloïde estimé par mesure de la radioactivité. Le conjugué obtenu contient 2,6 moles de vindésine par mole d'AH.

30

## b) Couplage en C-4 de la O-4-désacétyl-vindésine (AHgal-VDS-C-4)

Le choroacétate en C-4 de la O-4-désacétyl-vindésine radioactive (51 mg), dissous dans 2 mL de dioxanne est ajouté goutte à goutte à une solution de 200 mg de AHgal dans 17 ml de PBS et 3,4 ml de borate 1,7 N pH 9 (tampon phosphate). Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 h. Le conjugué est précipité par addition de 6 volumes d'acétone et centrifugé 30 min à 1300 rpm. Le précipité est lavé 2 fois dans l'acétone et centrifugé dans les mêmes conditions. Après ces deux rinçages le précipité est lyophilisé et purifié par filtration sur gel G-25 (3x90 cm) équilibré dans une solution de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M pH 7,8. Le pic exclu est récupéré et lyophilisé. Le contenu en protéine est mesuré par la technique de Lowry et le contenu en alcaloïde estimé par mesure de la radioactivité. Le conjugué obtenu contient 0,4 moles de vindésine par mole de AHgal.

## Exemple 5.

0-4-chloroacétate de N( O- 4- désacétyl- decarbomethoxy-3 vinblastin-23-oyl)  
20 L- isoleucinate d'éthyle ( BSA(S)-VIIe-C-4 )

En suivant le mode opératoire de l'exemple 2, à partir du dérivé correspondant de la vinblastine (voir brevet belge 889.136), on obtient le dérivé vinblastine-C-3-isoleucinate d'éthyle-0-4-chloroacétate avec un rendement de 85 %.

Spectre infra-rouge: 3470, 3410, 3040, 2970, 2880, 1740, 1680, 1615,  
1500, 1460, 1430, 1300, 1225, 1190, 1150, 1010, 740  $\text{cm}^{-1}$

30 Spectre de masse : 988 (M+17), 973(M+2), 939, 917, 391, 236, 94

Spectre de résonance magnétique nucléaire: ppm 9,85 (1H,s,OH), 8,6(1H,s,NH), 7,55(1H,d), 7,4(1H,d), 7,2-7,0 (m,3H), 6,65(1H,s), 6,1(1H,s), 5,85(1H,m), 5,58(1H,s), 5,32(1H,m), 4,6(1H,q), 4,2(2H,m), 4,0(2H), 3,78(3H,s), 3,1(3H,s), 2,7(3H,s), 1,28(3H,t), 1,0-0,8(14H,m).

5

En suivant le mode opératoire décrit dans l'exemple 3, on obtient le BSA(S)-VIIe-C-4.

Exemple 6

10 Vindésine O-4 hémisuccinate - pyrrolidine amide

En partant de la vindésine en appliquant un mode opératoire analogue à celui de l'exemple 12 on obtient le conjugué correspondant avec un rendement de 62 %.

15

Spectre de masse (DCI, isobutane) : 921 (M+14), 907 (M)

IR ( $\text{CHCl}_3$ , 4%) : 3400, 2975, 2882, 1732, 1693, 1632, 1503, 1462, 1380, 1247  $\text{cm}^{-1}$ .

20 RMN (360 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 8,05 (1H,H17), 5,46(1H,H15), 3,96 (1H,H17'a), 3,80(3H,OMe), 3,64 (3H,OMe), 3,45 (2 $\text{CH}_2$ -pyrrolidine), 2,88 (3H,N- $\text{CH}_3$ ), 0,95 (3H, $\text{CH}_3$ ), 0,83 (3H, $\text{CH}_3$ ).

Exemple 7.

25 Formation de l'hémisuccinate en O-4 de la vindésine et couplage avec l'albumine de sérum bovin (BSA) ( BSA-Succ-VDS )

30 Dans un ballon, on introduit 0,125 mmol de vindésine, 0,187 mmol d'anhydride succinique et 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre. La solution est agitée à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 14 h.

La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 0,250 mmol de triéthylamine ,0,250 mmol de chloroformiate d'éthyle et 5

mL de dioxane. On agite pendant 1/2 h. D'autre part, on prépare une solution de 90 mg de BSA dans 17,3 mL d' $H_2O$  et 17,3 mL de dioxane y sont ajoutés goutte à goutte. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la soude 1 N. La solution est refroidie à 5°C. Après 1/2 h l'ester activé est ajouté à la solution de BSA. La solution est agitée pendant 4 h à 5°C, tandis que le pH est maintenu à 8,5 par addition de NaOH 1N. La précipitation du conjugué et sa caractérisation sont effectués comme précédemment décrits. Le rapport molaire est d'environ 18 et reste constant après chromatographie sur sépharose 6B en présence de 10 guanidine 6M.

#### Exemple 8

15 Vindésine-0-4-hémisuccinate et couplage avec l'albumine humaine (AH) - (AH-Succ-VDS)

Dans un ballon, on introduit 0,28 mmol (210 mg) de vindésine, 42 mg (0,4 mmol) d'anhydride succinique, et 6 mL de  $CH_2Cl_2$  anhydre. La solution est agitée à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 14h. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 4,7 mL de dioxane. La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 0,56 mL de triéthylamine dans 3,5 mL de dioxane et 0,56 mL de chloroformate d'isobutyle dans 3,5 mL de dioxane.

On agite pendant 1h. D'autre part on prépare une solution de 208 mg de 25 AH dans 38 mL d' $H_2O$  et 26 mL de dioxane y sont ajoutés goutte à goutte. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la soude 1N. La solution est refroidie à 5°C. Après 1 h 00, l'ester activé est ajouté à la solution d'albumine humaine. La solution est agitée pendant 14h. à 5°C tandis que 30 le pH est maintenu à 8,5 par addition de NaOH 1N. La précipitation du conjugué et sa purification sont effectués comme précédemment décrits. Le rapport molaire est de 13,8.

## Exemple 9.

Vindésine-0-4-hémisuccinate et couplage avec l'albumine humaine galactosylée (AHgal) (AHgal-Succ-VDS).

5 Dans un ballon, on introduit 0,16 mmol (119 mg) de vindésine, 0,24 mmol (24 mg) d'anhydride succinique et 3,4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre. La solution est agitée à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 14 h. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 2,7 mL de dioxane. La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 0,32 mmol de triéthylamine dans 2 mL de dioxane et 0,32 mmol de chloroformate d'isobutyle dans 2 mL de dioxane. On agite pendant 1h. D'autre part, on prépare une solution de 164 mg d'AHgal dans 17,5 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  et 25 mL de dioxane y sont ajoutés goutte à goutte. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la soude 1N. La solution est refroidie à 5°C. Après 1h., l'ester activé est ajouté à la solution d'AHgal. La solution est agitée pendant 14 h à 5°C. tandis que le pH est maintenu à 8,5 avec de la soude 1N. La précipitation du conjugué et sa purification sont effectués comme précédemment décrits. Le rapport molaire est de 21,6.

20

## Exemple 10.

Vindésine-0-4-hémisuccinate et couplage avec des immunoglobulines non spécifiques de sérum de chèvre (IgG) (IgG-Succ-VDS)

25

Dans un ballon, on introduit 0,07 mmol (50 mg) de vindésine, 0,1 mmol d'anhydride succinique et 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre. La solution est agitée à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 14 h. Le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans 1 mL de dioxane. La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 0,14

mmol de triéthylamine et 0,14 mmol de chloroformiate d'isobutyle. On agite pendant 1 h. D'autre part, on prépare une solution de 66 mg d'IgG dans 12,7 mL d'H<sub>2</sub>O et 12,7 mL de dioxane y sont ajoutés goutte à goutte. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la soude 1N. La solution est refroidie à 5°C. Après 1h, l'ester activé est ajouté à la solution d'IgG. La solution est agitée pendant 14 h à 5°C tandis que le pH est maintenu à 8,5 par addition de NaOH 1N. La précipitation du conjugué et sa purification sont effectués comme précédemment décrits. Le rapport molaire est de 9.

10

Exemple 11.

Vindésine-0-4-hémisuccinate et couplage avec des immunoglobulines anti-milk fat globule polyclonales (IgG-anti-MFG) (IgG - anti-MFG-Succ-VDS)

Dans un ballon, on introduit 0.035 mmol de VDS (25 mg), 0,05 mmol d'anhydride succinique et 1ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre. La solution est agitée à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 14 h. Le solvant est évaporé et le résidu est repris dans 0.25 mL de dioxane. La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 0,07 mmol de triéthylamine et 0.07 mM de chloroformiate d'isobutyle. On agite pendant 1h. D'autre part, on prépare une solution de 25 mg d'IgG-anti-M.F.G. dans 21,3 mL d'H<sub>2</sub>O. Le pH est ajusté à 10,5 avec de la soude 1N. La solution est refroidie à 5°C. Après 1 h, l'ester activé est ajouté à la solution d'IgG-anti-M.F.G.. La solution est agitée pendant 14 h à 5°C tandis que le pH est maintenu à 8,5 par addition de NaOH 1N. Le conjugué est dialysé contre du NaCl 9°/oo et purifié sur Séphadex G 25 comme précédemment décrit. Le rapport molaire est de 15.

20

30

35

## Exemple 12.

## Vinblastine-0-4-hémisuccinate pyrrolidine amide (DAVLB-Pyrrolidino)

5 A une solution de 500 mg (0,651 mmol) de 0-4 déacétylvinblastine dans 15 mL de dichlorométhane anhydre, on ajoute 97,6 mg (0,976 mmol) d'anhydride succinique. La solution est agitée 20 h à température ambiante. On refroidit ensuite à 0°C par un bain de glace et ajoute goutte à goutte successivement une solution de 131,5 mg (1,303 mmol) de triéthylamine dans 8 mL de dichlorométhane et une solution de 141,2 mg (1,302 mM) de chloroformate d'éthyle dans 8 mL de dichlorométhane. On agite 1 h 30 à 0°C et ajoute 92,5 mg (1,302 mmol) de pyrrolidine en solution dans 8 mL de dichlorométhane. On laisse revenir à température ambiante et agite le mélange 2 heures. On ajoute 50 mL de dichlorométhane et 50 mL d'une solution aqueuse à 10% de carbonate de sodium. On agite, décante et sépare la phase organique. La phase organique est extraite 3 fois par du dichlorométhane. Les phases organiques réunies sont lavées par une solution aqueuse saturée en NaCl et séchées sur  $\text{MgSO}_4$ . Le résidu que l'on obtient après évaporation est purifié par chromatographie sur colonne de  $\text{SiO}_2$  (élution dichlorométhane/méthanol 92:8). Après trituration dans un mélange acétate d'éthyle/ cyclohexane, on obtient ainsi 386 mg de produit pur sous forme d'une poudre amorphe. Rendement : 64%.

25 Spectre de masse ( DCI ,isobutane) : 936 (M + 14), 922 (M)  
IR ( $\text{CHCl}_3$ , 58): 3477, 3015, 2980, 2885, 1741, 1635, 1505, 1450, 1250  
 $\text{cm}^{-1}$

Spectre de résonance magnétique nucléaire : ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz, ppm) :  
8,05 (NH, 1H), 7,53 (1H), 7,16 (3H), 6,66 (1H), 6,10 (1H), 5,85 (1H) et  
5,45 (1H) (H14,H15), 5,51 (1H,H17), 3,95 (1H,H17'a), 3,78 (3H,OMe),  
3,75 (3H,OMe), 3,60 (3H,OMe), 3,70 (1H,H2), 3,43 (7H), 3,11 (2H,  
5 HS<sup>1</sup>b+H6<sup>1</sup>b), 2,78 (2H, H21a'+H21<sup>1</sup>b), 2,70 (3H,NMe), 2,61 (1H, H21),  
2,25 (1H,H17'), 1,90 (2H,CH<sub>2</sub>-CO), 1,80 (2H,CH<sub>2</sub>CO), 1,73 (2H, beta  
pyrrolidine), 1,28 (2H,idem), 1,45 (1H, H15'a), 1,37 (1H, H14'b),  
0,86 (3H,CH<sub>3</sub>), 0,80 (3H,CH<sub>3</sub>), 0,76 (1H,H14').

10

**Exemple 13.**

Couplage de la vinblastine-0-4-hémisuccinate avec le tryptophanate  
d'éthyle

15

A une solution de 0,310 g (0,403 mmol) de 0-4-désacétylvinblastine dans 7 mL de dichlorométhane anhydre, on ajoute 52 mg (0,524 mmol) d'anhydride succinique. La solution est agitée 15 heures à température ambiante puis refroidie à 0°C. Après addition successive d'une solution de 81 mg (0,806 mmol) de triéthylamine dans 5 mL de dichlorométhane et d'une solution de 87 mg de chloroformate d'éthyle dans 5 mL de dichlorométhane, le mélange réactionnel est agité 1 h 30 à 0°C. On ajoute ensuite 187 mg (0,806 mmol) de L-tryptophanate d'éthyle en solution dans 7 mL de dichlorométhane. On laisse revenir à température ambiante et agite le mélange pendant 15 h.

30

35

La solution est ensuite traitée comme dans l'exemple 12. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de  $\text{SiO}_2$  (élution éther-méthanol saturé en  $\text{NH}_3$  92:8). On obtient ainsi 305 mg du produit pur sous forme d'une poudre blanche après trituration dans 5 l'isopropanol. Rendement 70%.

Spectre de masse (DCI, isobutane): 1097 ( $M+14$ ), 1083 ( $M$ )  
 IR ( $\text{CHCl}_3$ ) : 3460, 2995, 2960, 2870, 1735, 1669, 1613, 1502, 1457, 1331, 1251, 1167, 1010  $\text{cm}^{-1}$   
 10 UV (méthanol, max, log ) : 216 (4,87), 265 (4,27), 288 (3,01)  
 RMN (360 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 8,44(1H, NH), 8,08(1H, NH), 7,52(2H), 7,33(1H), 7,10(6H), 6,66(1H, H9), 6,06(1H, H12), 5,86 (1H, H14), 5,50(1H, H17), 5,38(1H, H15), 4,91(1H), 4,10(2H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3,76(3H, OMe), 3,72 (3H, OMe), 3,63 (3H, OMe), 3,13 (2H,  $\text{H}_5'\text{b}+\text{H}_6'\text{b}$ ), 2,80(H21'), 2,68 (N $\text{CH}_3$ ), 0,90 ( $\text{CH}_3$ , 3H), 0,78( $\text{CH}_3$ , 3H), 0,74 (H14').

Exemple 14.

20 Couplage de la N-(04-désacétyl-04-hémisuccinate-deoxy-vinblastinoyl-23) tryptophanate d'éthyle avec la pyrrolidine.

Une solution de 400 mg (0,419 mmol) de N-(04-désacétyl-deoxy-vinblastinoyl-23) tryptophanate d'éthyle (voir brevet belge 889.136), de 105 mg (1,05 mmol) d'anhydride succinique dans 20 mL d'un mélange dioxane-toluène (50:50) est portée au reflux 3 heures. Après distillation des solvants sous vide, le résidu est dissous dans 20 mL de dichlorométhane anhydre. Après refroidissement à 0°C et addition successive d'une solution de triéthylamine (126 mg, 1,25 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane et d'une solution de chloroformate d'éthyle (136 mg, 1,25 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane, le milieu est agité 1 heure. Une solution de pyrrolidine (178 mg, 2,5 mmol) dans 5 mL de dichlorométhane est ensuite ajouté à 0°C. Après retour à température

ambiante, la solution est agitée 4 h et ensuite répartie entre 50 mL de dichlorométhane et 50 mL d'une solution aqueuse à 5% de carbonate de potassium. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite avec 2 portions de 20 mL de dichlorométhane. Les extraits organiques sont combinés, lavés successivement par 40 mL d'eau et par 40 mL d'une solution aqueuse saturée en NaCl, séchés sur du sulfate de magnésium et évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur  $\text{SiO}_2$  (élution par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  95:5) et trituration dans l'éther. Rendement : 346 mg (75%) du composé recherché.

10

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz) bs=singulet large

9.23 (1H,bs,NH), 7.95 (H,bs), 7.45-7.65(3H,m), 7.33(1H,m), 7.03-7.21 (6H,m), 6.46 (1H,s), 6.05 (1H,s), 5.83 (1H,m), 5.53 (1H,s), 5.33 (1H,m), 5.01 (1H,m), 4.11 (2H,m), 3.76 (3H,s), 3.58 (3H,s), 3.48 (4H,m), 2.75 (3H,s), 2.65 (1H,s), 2.30 (1H,m), 1.93 (2H,m), 1.85 (2H,m), 1.21 (3H,t), 0.88 (3H,t), 0.76 (3H,t)

1679, 1617, 1501, 1460, 1180  $\text{cm}^{-1}$ .

20

### Exemple 15.

Deoxy-4'-vinblastinoyl-23-tryptophanate d'éthyle-0-4-hémisuccinate et  
couplage avec l'albumine de sérum bovin (BSA) (BSA-Succ-Déoxy-V-  
TrpE)

Dans un ballon, on introduit 400 mg (0,419 mmol) de déoxy V TrpE, 126 mg (1,25 mmol) d'anhydride succinique et 20 mL de toluène : dioxane 1:1. La solution est portée à reflux pendant 3 h. Les solvants sont évaporés et le résidu est repris dans 20 mL de dioxane.

La solution est ensuite plongée dans un bain de glace. On y ajoute 1.26 mmol (126 mg) de triéthylamine, 1.25 mM de chloroformiate d'isobutyle et 5 mL de dioxane. On agite pendant 1 h.

35

D'autre part, on prépare une solution de 340 mg de BSA dans 65 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  et 28 mL de dioxane y sont ajoutés goutte à goutte. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la soude 1 N. La solution est refroidie à 5°C. Après 1 h, l'ester activé est ajouté à la solution de BSA. La solution est agitée pendant 14 h à 5°C. tandis que le pH est maintenu à 8,5 par addition de NaOH 1N. La précipitation du conjugué et sa purification sont effectuées comme précédemment décrits.

10 Exemple 16.

Couplage de la 04-désacétyl-04-hémisuccinate-désoxy-vindésine avec le tryptophanate d'éthyle

15 Suivant le procédé décrit dans l'exemple 12, mais en remplaçant la pyrrolidine par une quantité équimolaire de L-tryptophanate d'éthyle, on obtient 47 % du composé recherché.

20 Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz) :  
8,45 (1H, bs), 8,02 (1H,bs), 7,50 (2H,m), 7,32 (1H,m), 7,23-7,06 (6H,m), 7,02 (1H,m), 6,50 (1H,s), 6,10 (1H,s), 5,86 (1H,m), 5,50 (1H,s), 5,45 (1H,m), 5,35 (1H,s), 2,86 (3H,s), 2,67 (1H,s), 2,46 (4H,m), 1,30 (3H,t), 0,90 (3H,t), 0,75 (3H,t).

25 Spectre infra-rouge ( $\text{CHCl}_3$ , 5% v:v): 3480, 3400, 3010, 2978, 2882, 1732, 1690, 1615, 1505, 1460, 1298  $\text{cm}^{-1}$

30

35

## Exemple 17

Couplage de la N-(O-4-désacétyl-04-hémisuccinate-vinblastinoyl-23) tryptophanate d'éthyle avec la pyrrolidine

5

Suivant le procédé décrit dans l'exemple 14 au départ de 700 mg de N(O-4-déacétyl-vinblastinoyl-23) tryptophanate d'éthyle, après purification par chromatographie sur  $\text{SiO}_2$  et trituration dans l'éthanol on obtient 518 mg (64%) du composé désiré.

10

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $\text{CDCl}_3$ , 360 MHz):  
8,04(1H,bs), 7,46-7,63(3H,m), 7,33(1H,m), 7,20-7,03(6H,m),  
6,63(1H,s), 6,08(1H,s), 5,83(1H,m), 5,55 (1H,s), 5,33 (1H,m),  
5,06(1H,m), 4,13(2H,m), 3,96(1H,m), 3,76(3H,s), 3,61(3H,s),  
15 3,46(4H,m), 3,40(2H), 2,81(2H,m), 2,73(3H,s), 2,65(1H,s), 1,85(m),  
1,20(t,3H), 0,89(t,3H), 0,71(t,3H).

Spectre infra-rouge ( $\text{CHCl}_3$  5%, v:v): 3474, 3002, 2977, 2882, 1730,  
1678, 1617, 1500, 1460, 1173  $\text{cm}^{-1}$

20

## Exemple 18

Couplage de la 0-4 - désacétyl-0-4 - hémiglutarate vinblastine avec la pyrrolidine

25

Une solution de 0-4-deacétylvinblastine (700 mg, 0,911 mmol), d'anhydride glutarique (145 mg, 1,27 mmol) dans 25 mL de dichlorométhane anhydre est agitée à l'abri de la lumière pendant 70 h. Après refroidissement à 0°C et addition successive d'une solution de N-méthyl pipéridine (163 mg, 1,64 mmol) dans 7 mL de dichlorométhane et d'une solution de chloroformate d'isobutyle (223 mg, 1,64 mmol) dans 7 mL de dichlorométhane, le milieu est agité 1 h. Une solution de pyrrolidine (194 mg, 2,73 mmol) dans 7 mL de dichlorométhane est ensuite ajoutée à 0°C.

35

Après retour à la température ambiante, la solution est agitée 5 h. Elle est ensuite répartie entre 60 mL de dichlorométhane et 60 mL d'une solution aqueuse à 5% de carbonate de potassium. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite par 2 portions de 30 mL de dichlorométhane. Les extraits organiques sont combinés, lavés par de l'eau et par une solution aqueuse saturée en NaCl, séchés sur  $MgSO_4$  et évaporés sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur  $SiO_2$  (élution  $CH_2Cl_2:CH_3OH$  95:5) et trituration dans un mélange acétate d'éthyle:heptane. Rendement 605 mg (71%) du composé recherché.

Spectre de résonance magnétique nucléaire ( $CDCl_3$ , 360 MHz):  
7,95 (1H,bs), 7,45(1H,m), 7,16-7,00(3H,m), 6,55(1H,s), 6,02(1H,s),  
5,76(1H,m), 5,40(1H,s), 5,20(1H,m), 3,88(1H,m), 3,71(6H,2s),  
15 3,53(3H,s), 3,38(4H,m), 2,62(3H,s), 2,58(1H,s), 1,92(4H,m),  
1,80(2H,m), 0,80(3H,t), 0,73(3H,t).  
Spectre infra-rouge ( $CHCl_3$ , 5% v:v): 3473, 3003, 2977, 2884, 1738,  
1620, 1500, 1460, 1301  $cm^{-1}$

20 Les composés de l'invention ont été testés sur des souris  $BDF_1$  ou  $DBA_2$  auxquelles une leucémie P388 a été implantée par voie intra - péritonéale ou intra-veineuse, l'activité anti-tumorale étant mesurée par le pourcentage d'ILS (Increased Life Span, augmentation de la durée de survie).

25 Ainsi des expériences effectuées avec la vindésine, le N-(04-déacetyl-3-de (méthoxycarbonyl)- vinblastinoyl-23) tryptophanate d'éthyle (voir demande de brevet européen Publ. n° 41.935, Omnichem), ainsi que d'autres dérivés en C-4 d'acides aminés, couplé via le carbone C-3 avec la fétuine ou l'albumine de sérum bovin dans un rapport variant de 2 à 6, démontrent que ces conjugués sont peu actifs sur les tumeurs P388 (voir tableau).

L'administration du conjugué a été effectuée par voie intra-péritonéale ou intra-veineuse, identique au mode d'injection de la tumeur.

Par contre ces mêmes substances pour lesquels le couplage est effectué 5 en C-4 montrent, de manière inattendue, une activité significative à l'occasion de tests similaires. Des augmentations de durée de survie de plus de 70% ont été observées.

10 L'activité supérieure des conjugués protéiques de la présente invention a également été mise en évidence sur des cellules L1210 in vitro en milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal. Après incubation, la 15 technique adoptée consiste à mesurer le contenu en protéines cellulaires, estimation effectuée en adoptant la technique de Lowry. Ainsi après 3 jours à une concentration de 10-50 microgrammes/mL de BSA(S)-C4-VDS on obtient une inhibition de la croissance cellulaire, alors que la culture 20 cellulaire non traitée s'est multipliée par un facteur 2,5.

Des cellules de l'hépatome Hep. G2 (300.000 cellules) ont été incubées 25 pendant 8 jours en présence d'AHgal - VDS-C-4 et d'AHgal-VDS-C-3 à des concentrations variant de 1,3 à 21,700 ng de VDS/ml.

Après 8 jours, le taux de protéines cellulaires est estimé par la technique de Lowry.

Les résultats montrent que la concentration en drogue tuant 50% des 20 cellules est >1.000ng/ml dans le cas de l'AHgal-VDS-C<sub>3</sub> et est de 25 215ng/ml dans le cas de l'AHgal-VDS-C<sub>4</sub>.

## TABLEAU

ACTIVITES DE DERIVES DE LA VINBLASTINE POUR DES  
TUMEURS INDUITES CHEZ LA SOURIS.

5

	PRODUITS	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
10	BSA-TrpV-C-3	2	10	423	DBA <sub>2</sub>	$10^4$	P388 iv	9,4	
	BSA(S)TrpV-C-3	2	6,3	261	DBA <sub>2</sub>	$10^4$	P388 iv	-8	
	Fét-VDS-C-3	6	15	298	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	4,1	
	Fét(S)-VDS-C-3	2	15	298	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	8,2	
15	Fét-(I)Le-VDSC3	2	10	294	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	2,6	
	BSA-VDS-C-4	1,7	8	398	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	2	
		2,7	16	500	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	48	
	BSA(S)-VDS-C-4	2,5	10	332	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	76	
		2,4	27,5	968	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	71	
20	BSA(S)-VIIe-C-4	1,3	3	165	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	18	
		1,3	10	550	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	20	
		1,3	14	771	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	32	
	BSA-Succ-VDS	18	35	173	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	39	
		18	75	371	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	79	
25	BSA-(S)-Succ-VDS	32	35	97	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	39	
	BSA-(S)-Succ-VDS (passé sur guanidine)	32	75	208	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	79	
		32	75	208	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	58	
	BSA-Succ-VDS	34	75	196	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	42	
	BSA-Succ-VDS (passé s/noir animal)	19	75	351	BDF <sub>1</sub>	$10^5$	P388 ip	36	
30		16,6	75	403	BDF <sub>1</sub>	$10^5$	P388 ip	47	
	(passé sur guanidine)	17	75	393	BDF <sub>1</sub>	$10^5$	P388 ip	42	
	IgG nonspéc-Succ VDS	24	75	643	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	77	
	A Hgal-Succ-VDS	21,6	75	356	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388 ip	57	
35	BSA-Succ-deoxyVTrpF			342	trace	$10^6$	none	0-	

## TABLEAU (SUITE)

		(b)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)
5	VDS-Chloroacét	4	DBA <sub>2</sub> FR	$10^5$	P388	iv	
		8	DBA <sub>2</sub> FR	$10^5$	P388	iv	38
10		10	DBA <sub>2</sub> FR	$10^5$	P388	iv	57
		14	DBA <sub>2</sub> FR	$10^5$	P388	iv	70
		12	DBA <sub>2</sub> US	$10^5$	P388	iv	63
15	VILE-Chloroacét	15	BDF <sub>1</sub>	$10^6$	P388	ip	>60
		4	DBA <sub>2</sub>	$10^6$	P388	ip	24
		8	DBA <sub>2</sub>	$10^6$	P388	ip	52
20	DAVLB-Pyrrolidino	12	DBA <sub>2</sub>	$10^6$	P388	ip	80
		16	DBA <sub>2</sub>	$10^6$	P388	ip	-29
		6,25	DBA <sub>2</sub>	$10^5$	P388	iv	9
25		12,5	DBA <sub>2</sub>	$10^5$	P388	iv	20
		25	DBA <sub>2</sub>	$10^5$	P388	iv	43
		50	DBA <sub>2</sub>	$10^5$	P388	iv	82

(a) rapport molaire vinca:protéine  
 25 (b) dose mg vinca/kg  
 (c) dose mg protéine/kg  
 (d) souche de souris  
 (e) nombre de cellules injectées  
 (f) type de la tumeur injectée  
 30 (g) voie d'injection  
 (h) pourcentage d'augmentation du temps de survie des  
 survivants comparativement à des souris non-traitées (ILS).

La présente invention s'étend donc également aux applications industrielles et notamment pharmaceutiques des composés bisindoliques nouveaux.

5 Les composés de l'invention présentent en effet des propriétés antitumorales particulièrement intéressantes et susceptibles d'être utilisées en thérapeutique humaine.

10 Ces dérivés de la vinblastine peuvent être, en particulier, utilisés pour le traitement des leucémies, de gliomes, de lymphosarcomes ou d'autres tumeurs malignes, y compris les tumeurs dites "solides".

En thérapeutique humaine, ils sont ainsi utilisés pour le traitement de la maladie de Hodgkin et pour d'autres tumeurs pouvant bénéficier d'un traitement avec la vinblastine, la vincristine ou la vindésine.

Pour leur application thérapeutique, les composés de l'invention, éventuellement sous forme lyophilisée, sont de préférence administrés par voie parentérale, dissous dans un solvant pharmaceutiquement acceptable. Parmi les sels d'addition, on préférera, les sels non toxiques pharmaceutiquement acceptables, tels que les sels d'acides minéraux comme l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique et l'acide sulfurique ou d'acides organiques comme l'acide acétique, propionique, succinique, tartrique, oxalique, méthanesulfonique ou benzènesulfonique.

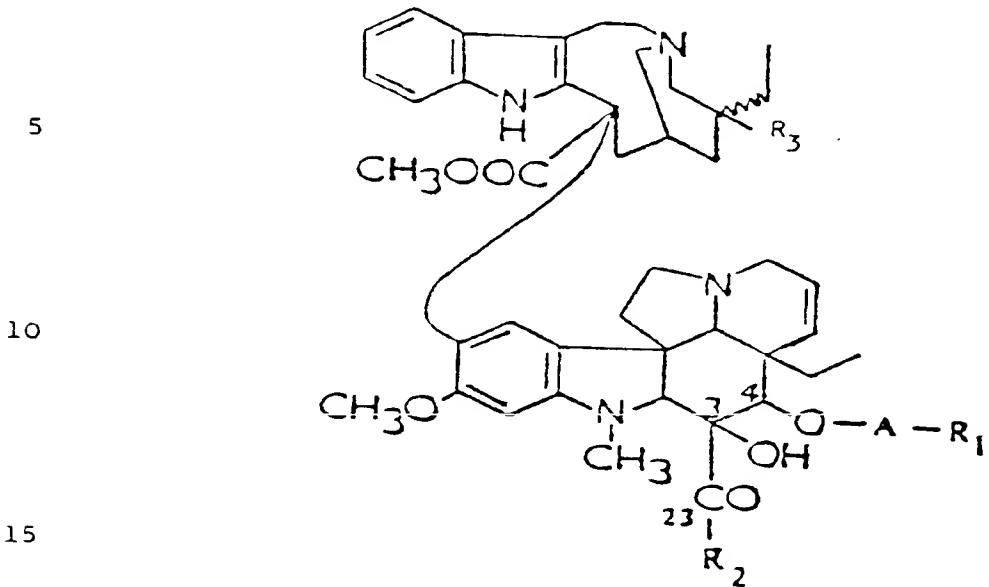
L'eau physiologique ou d'autres solutions salines tamponnées, par exemple avec un phosphate, sont des solvants appropriés.

30 La substance active est généralement administrée à une posologie pouvant varier de 50 mg à plusieurs grammes. Les composés de l'invention peuvent en outre être utilisés en combinaison avec d'autres agents anti-tumoraux.

## REVENDICATIONS :

1. Conjugués de la vinblastine ou de dérivés de la vinblastine avec des protéines, des fragments de protéines, des acides aminés ou des amines simples caractérisés en ce que le couplage est effectué par l'intermédiaire d'un groupe ester dérivé du groupe hydroxyle du carbone 4 du squelette de la vinblastine.  
5
2. Conjugués suivant la revendication 1 caractérisés en ce que la protéine, le fragment de protéine ou l'amine est couplée au composé de type vinblastine par l'intermédiaire d'un bras, par condensation préalable du dérivé de la vinblastine avec un dérivé organique bifonctionnel, éventuellement activé.  
10
3. Conjugués suivant la revendication 2 caractérisés en ce que le composé bifonctionnel est le chlorure de l'acide chloroacétique, l'anhydride chloroacétique, l'anhydride succinique ou l'anhydride glutarique.  
15
4. Conjugués suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'une protéine ou un fragment de protéine est couplé par une liaison ester au groupe hydroxyle en C-4 de la vinblastine, de la vindésine ou d'un dérivé vinblastinoyl-23 d'ester d'acide aminé.  
20
5. Conjugués suivant les revendications 1 à 4 caractérisés en ce que le dérivé de la vinblastine est la O-4-désacétylvinblastine.  
25
6. Conjugués suivant les revendications 1 à 4 caractérisés en ce que le dérivé de la vinblastine est la O-4-désacétyl-désoxy-4'-vinblastine.

7. Conjugués de vinblastine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 de formule:



20 dans laquelle A représente un "bras" tel que  $-COCH_2-$ ,  $-CO(CH_2)_n-CO-$ , n variant de 1 à 5,  $R_1$  représente un radical protéique éventuellement modifié,  $R_2$  représente un groupe méthoxy, un groupe amino ou un radical ester d'acide alpha-aminé lié par une liaison de type amide et dont le groupe ester comporte de 1 à 6 atomes de carbone,  $R_3$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle, chaque fois dans les deux configurations possibles, ainsi que leurs sels d'addition avec un acide minéral ou organique.

25

30 8. Conjugués selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que le radical protéique est dérivé de la fétuine ou de l'albumine.

9. Conjugués suivant l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le radical protéique est dérivé d'une immunoglobuline.

10. Conjugués suivant l'une quelconque des revendications 5 1 à 9, caractérisés en ce que le radical protéique est dérivé d'un anticorps monoclonal.

11. Conjugués suivant l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisés en ce que l'ester d'acide aminé est le tryptophane d'éthyle.

12. Conjugués suivant l'une quelconque des revendications 10 4 à 7, caractérisés en ce que l'ester d'acide aminé est l'isoleucinate d'éthyle.

13. Conjugués suivant la revendication 7, caractérisés en ce que  $R_2$  représente un groupe méthoxy ou amino.

14. Conjugués suivant la revendication 7, caractérisés en 15 ce que  $R_3$  représente un atome d'hydrogène ayant la configuration de la désoxy-4'-vinblastine B.

15. Conjugués suivant l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que le groupe amine est un 20 groupe  $NR_4R_5$ , ou un ester d'acide aminé lié via la fonction amine et,  $R_4$  et  $R_5$  représentent des groupes alkyle comportant de 1 à 3 atomes de carbone ou, ensemble, un groupe alkanediyle comportant de 3 à 5 atomes de carbone.

16. Procédé de préparation de conjugués suivant l'une 25 quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'on condense, dans une première étape, le chlorure d'acide chloroacétique ou un anhydride sur l'hydroxyle en position C-4 de la O-4-désacétylvinblastine ou l'un des dérivés du type O-4-désacétylvinblastine-

30

carboxamide-3 et en ce qu'on condense ensuite les dérivés ainsi obtenus avec la protéine, l'acide aminé ou l'amine simple dans un solvant dans lequel ces composés sont solubles.

5

17. Procédé suivant la revendication 16, caractérisé en ce que l'anhydride utilisé dans la première étape de condensation est l'anhydride succinique ou l'anhydride glutarique.

10

18. Procédé suivant l'une des revendications 16 ou 17, caractérisé en ce que le solvant utilisé dans la deuxième étape de condensation consiste en un mélange eau-dioxane à un pH adéquat maintenu par un tampon.

15

19. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 16 à 18, caractérisé en ce qu'on isole le conjugué obtenu par précipitation du milieu réactionnel et en ce qu'on effectue encore une centrifugation, un rinçage, une lyophilisation et une purification par filtration sur gel, ainsi qu'éventuellement une succinylation classique.

20. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que les protéines utilisées sont traitées afin d'être sélectivement modifiées.

21. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 16 à 20, caractérisé en ce qu'on utilise, comme protéine, l'albumine de serum bovin ou humain, la fétuine ou des 30 immunoglobulines éventuellement obtenues par la technique des anticorps monoclonaux, de préférence d'anti-corps monoclonaux humains.

22. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle 35 comporte les conjugués selon l'une des revendications 1 à 15 en combinaison avec un diluant, solvant, excipient ou

23. Composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisée en ce que le composé actif se trouve sous forme lyophylisée.

24. Composition pharmaceutique selon la revendication 22, 5 caractérisée en ce que le composé actif est en solution dans un solvant tamponné.

25 Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 pour le traitement des leucémies, de gliomes, de lymphosarcomes ou d'autres tumeurs malignes, 10 y compris les tumeurs dites "solides", ainsi que pour le traitement de la maladie de Hodgkin.